

Г. С. Нагибина, У. Ф. Джус, А. С. Глухов, Т. Н. Мельник, Б. С. Мельник

## МЕТОД СТАБИЛИЗАЦИИ БЕЛКОВ, ОСНОВАННЫЙ НА ПРЕДСКАЗАНИИ НАТИВНО-РАЗВЁРНУТЫХ УЧАСТКОВ. СТАБИЛИЗАЦИЯ БЕЛКА Gao\*

Институт белка РАН, Российская Федерация, 142290, Московская область, Пушкино, ул. Институтская, 4

Исследован белок Gao из *Drosophila melanogaster*. Авторы спроектировали SS-связь в этом белке таким образом, чтобы увеличить его стабильность. Выбор участка полипептидной цепи для введения цистеинового мостика основывался на расчётах программ, которые используются для предсказания нативно-развёрнутых белков. В предыдущих работах высказывалось предположение, что в структурированных белках такие программы предсказывают не нативно-развёрнутые, а «ослабленные» участки белка, которые не способны приобрести жёсткую структуру без дополнительных гидрофобных взаимодействий. Соответственно введение SS-связей в таких участках с большой вероятностью приведёт к стабилизации белка. Этот подход использовался в представленной работе. Методом микрокалориметрии показано, что спроектированный SS-мостик привёл к увеличению температуры плавления одного из доменов белка Gao на 4 К. Библиогр. 20 назв. Ил. 3. Табл. 1.

**Ключевые слова:** Gao, дифференциальная сканирующая микрокалориметрия, SS-мостик, стабильность белка, нативно-развёрнутые белки.

G. S. Nagibina, U. F. Dzhus, A. S. Glukhov, T. N. Melnik, B. S. Melnik

## METHOD OF PROTEIN STABILIZATION BASED ON PREDICTION OF INTRINSICALLY DISORDERED REGIONS. STABILIZATION OF PROTEIN Gao

Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 4, Institutskaya ul., Pushchino, Moscow Region, 142290, Russian Federation

Protein Gao from *Drosophila melanogaster* has been studied. We have designed an SS-bridge in this protein in such a way that its stability could be increased. The choice of a region in the polypeptide chain for insertion of the cysteine bridge was based on calculations performed using programs for the prediction of intrinsically disordered proteins. In our previous paper we proposed that, in structured proteins, these programs predict “weakened” protein regions unable to have a rigid structure without additional hydrophobic interactions rather than intrinsically disordered regions. Consequently, insertion of SS-bridges in such regions will most probably lead to stabilization of the protein. It was just this approach that was used in the presented study. It is demonstrated with the microcalorimetry method that the insertion of the designed SS-bridge resulted in 4 K increase in the melting temperature of one domain of protein Gao. Refs 20. Figs 3. Tables 1.

**Keywords:** Gao, differential scanning microcalorimetry, SS-bridge, protein stability, protein intrinsic disorder.

**Введение.** Существуют теоретические методы, которые по аминокислотной последовательности белка предсказывают, принадлежит данный белок к классу жёстко упакованных или к классу нативно-развёрнутых белков [1, 2]. Согласно им практически в каждом плотно упакованном белке есть небольшие участки полипептидной цепи

\* По материалам IV конференции «Современные проблемы молекулярной биофизики», посвящённой 50-летию специализации «Молекулярная биофизика» на физическом факультете и 105-летию со дня рождения профессора Э. В. Фрисмана, 14–15 июня 2016 г., СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия, URL: <http://molbioph.niif.spbu.ru/conference>.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант РНФ N14-24-00157).

© Санкт-Петербургский государственный университет, 2016

(10–20 аминокислотных остатков), которые могут быть отнесены к нативно-развёрнутым. При этом из кристаллографических или ЯМР-исследований известно, что эти участки структурированы и ничем особо не отличаются от других участков белка. Такое несоответствие теоретических предсказаний и экспериментальных данных вряд ли можно объяснить ошибкой расчётов, поскольку одни и те же участки белка предсказываются как нативно-развёрнутые программами, основанными на совершенно разных методах. Так, например, одни программы используют статистику встречаемости в разных белках отдельных аминокислотных остатков или участков полипептидной цепи [1, 3, 4], а другие — сравнивают структуры белков с помощью нейронных сетей [5–7]. Многие исследователи считают, что реализованные в этих программах алгоритмы позволяют предсказать не столько принадлежность участка полипептидной цепи к нативно-развёрнутым (т. е. подвижность и неструктурированность), а скорее неспособность этого участка самостоятельно приобретать жёсткую структуру. Если это так, то программы, предсказывающие положение нативно-развёрнутых участков в белке, могут помочь в поиске «слабых» участков в глобулярных белках. В свою очередь, именно эти участки можно считать главными «кандидатами» для введения SS-связи в случаях, когда перед экспериментаторами стоит задача увеличить стабильность белка. В предыдущей нашей работе мы проверили это предположение на зеленом флуоресцентном белке (GFP) [8, 9].

В представляемом исследовании мы стабилизировали белок Gao из *Drosophila melanogaster* путём введения SS-мостика. Белок Gao является наиболее распространённым и мало изученным представителем  $\alpha$  субъединиц гетеротримерных G-белков, состоящих из трёх субъединиц:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . G-белки играют важную роль в передаче сигналов в эукариотической клетке, взаимодействуя с ассоциированными с ними трансмембранными рецепторами суперсемейства GPCR [10].

В процессе опытов Gao из *D. melanogaster* оказалось, что его сложно закристаллизовать. Мы предположили, что увеличение стабильности этого белка поможет в его кристаллизации и дальнейшем изучении.

Для того чтобы увеличить стабильность белка, необходимо найти его самый слабый структурный элемент. В структуре  $\alpha$  белков можно выделить два домена, один из которых отвечает за связывание молекулы ГДФ. Если сравнивать белки из разных организмов, то они различаются в основном вторым (спиральным) доменом. Именно этот домен мы решили стабилизировать введением дисульфидной связи. Введённая SS-связь стабилизировала выбранный домен белка Gao на 4 К. Сейчас ведётся работа по кристаллизации мутантной формы этого белка.

### Материалы и методы.

**Экспрессия и очистка белка.** Клетки *Escherichia coli* M15 pREP4 (Quagen) трансформировали плазмидой pQE30-Gao, содержащей ген белка Gao. Плазида с геном Gao-V82T была сконструирована по стандартной ПЦР-методике с использованием соответствующих праймеров и вектора pET-28a в качестве матрицы. Правильность последовательностей обоих белков проверяли секвенированием. Белок был выделен и очищен, как описано в [11]. Чистоту препарата оценивали с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS.

**Химия белка.** Концентрация белка определялась по поглощению на 280 нм с коэффициентом экстинкции  $A_{280}^{0.1\%} = 0,77$  [11]. Формирование дисульфидной связи в мутантной форме Gao-V82C происходит спонтанно в буфере 20 mM BICINE, pH = 7,5, и проверяется электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS (по Лэммли) [12], без добавления восстановителей. Мутантную форму белка Gao-V82C с завязанной SS-связью

получали путём инкубации при 100-кратном избытке DTT в течение 30 мин при 37°C в буфере 20 мМ BICINE, pH = 7,5, затем проводили диализ против буфера 20 мМ BICINE, 1 мМ DTT (DTT необходим для предотвращения самоокисления SH-групп в растворе).

**Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия.** Микрокалориметрические измерения проводились на дифференциальном сканирующем микрокалориметре SCAL-1 (ИБП РАН) со стеклянной ячейкой объёмом 0,33 мл при скорости сканирования 1 К/мин и под давлением 2,5 атм [13]. Концентрация белка в экспериментах составляла 1,0 мг/мл в буфере 20 мМ BICINE, pH = 7,5. Зависимость молярной теплоёмкости от температуры рассчитывали стандартным способом [14] и в дальнейшем анализировали с использованием программы SigmaPlot (Jandel, USA).

### Результаты и обсуждение.

**1. Поиск «ослабленных» участков в аминокислотной последовательности белка Gao из *D. melanogaster*.** Белок Gao состоит из двух доменов. Домен I образован N- и C-концевыми частями полипептидной цепи белка (1–64 и 181–345), домен II — её средней частью (65–180) [15]. Домен I белка Gao обладает ГТФ-азной активностью и способен связывать молекулу ГДФ. Аминокислотная последовательность этого домена достаточно консервативна в белках из разных организмов. Домен II гораздо больше отличается по аминокислотному составу в белках из разных организмов. Именно это отличие может служить причиной нестабильности или подвижности домена II белка Gao из *D. melanogaster*, в результате которой он плохо кристаллизуется. Поэтому мы решили стабилизировать именно домен II в белке Gao.

Для поиска «ослабленных» участков в белке Gao использовались программы PONDR-FIT и IsUnstruct [1, 2]. На рис. 1 показана вероятность для разных аминокис-

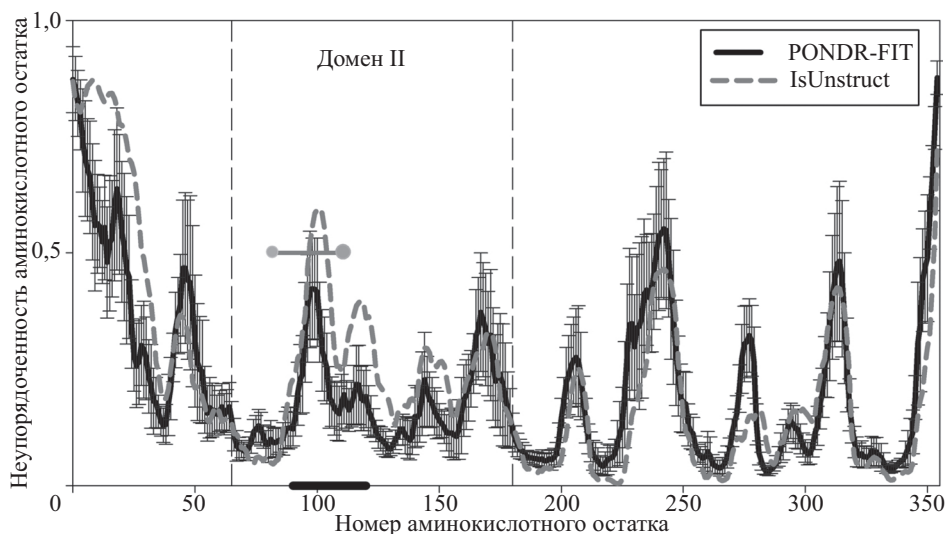


Рис. 1. Вероятность аминокислотных остатков в белке Gao из *D. melanogaster* быть неупорядоченными (в нативно-развёрнутом состоянии):

вертикальными пунктирными линиями выделен участок аминокислотной последовательности белка (65–180), образующий один из доменов Gao (домен II); чёрной полоской внизу графика показан участок аминокислотной последовательности (90–120), который предполагалось стабилизировать введением SS-мостика; серыми кружочками показано положение аминокислотных остатков, между которыми спроектирован цистеиновый мостик

лотных остатков белка Gao быть в нативно-развёрнутом состоянии. Видно, что графики похожи. Вертикальными пунктирными линиями выделен участок аминокислотной последовательности Gao, образующий домен II (аминокислоты 65–180). Обе использованные для расчётов программы предсказывают достаточно высокую вероятность участка аминокислотной последовательности 90–120 быть в нативно-развёрнутом состоянии. Именно этот «ослабленный» участок мы и решили стабилизировать введением SS-мостика.

**2. Проектирование SS-связи в Gao из *D. melanogaster*.** Проектирование SS-связи в белке Gao из *D. melanogaster* затруднено, так как неизвестна пространственная структура этого белка. Поэтому мы использовали довольно часто применяемый подход, суть которого состоит в следующем.

1. Выбрать белок с известной пространственной структурой, высоко гомологичный «нашему» — «модельный» белок.

2. В пространственной структуре «модельного» белка найти сближенные аминокислотные остатки, замена которых на остатки цистеинов приведет к образованию SS-мостика.

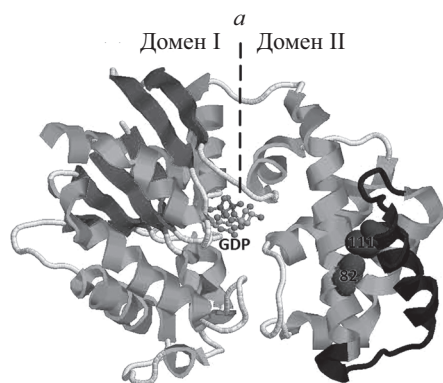
3. Сопоставить аминокислотные последовательности «нашего» белка и «модельного» белка. По выравниванию аминокислотных последовательностей двух белков определить, какие аминокислотные остатки в «нашем» белке соответствуют аминокислотным остаткам, которые выбраны в «модельном» белке для введения SS-мостика.

Таким образом, можно выбрать аминокислотные остатки, замена которых на остатки цистеинов позволит ввести SS-мостик в белок, пространственная структура которого неизвестна.

В качестве «модельного» белка мы использовали белок Gao из *M. musculus*, пространственная структура которого известна (структура в PDB: 3C7K [16]), а аминокислотная последовательность высоко гомологична последовательности белка Gao *D. melanogaster*. Гомология всего белка 99%, домена, включающего аминокислотные остатки 65–180, составляет 76%.

На рис. 2, а показана структура Gao из *M. musculus*. Чёрным цветом выделен участок от 90 до 120 аминокислотного остатка, который, по предсказанию программ, может быть нативно-развёрнутым, а следовательно, самым нестабильным. Пунктирной линией разделены два домена этого белка: домен I — аминокислотные остатки 35–64 и 181–345; домен II — аминокислотные остатки 65–180. Аминокислотные остатки 82 и 111, между которыми спроектирован дисульфидный мостик, показаны объёмными. Домен I белка Gao связывает молекулу ГДФ (структура показана на рисунке). Именно этот участок белка мы решили стабилизировать, «сшив» цистеиновым мостиком две контактирующие  $\alpha$ -спирали. Для этого мы выбрали A82 и V111 в белке Gao из *M. musculus*. Поворот и взаимное расположение этих аминокислотных остатков подходят для образования SS-связи. Сравнение аминокислотных последовательностей белков Gao из *M. musculus* и *D. melanogaster* показало, что в белке Gao из *D. melanogaster* выбранным нами аминокислотным остаткам соответствуют остатки валина и цистеина.

На рис. 2, б показано выравнивание аминокислотной последовательности доменов II этих двух белков. Выравнивание выполнено программой BLAST [20]. Серым цветом выделены аминокислотные остатки, различающиеся в обеих последовательностях. Рамочкой отмечены остатки 82 и 111, между которыми спроектирована SS-связь. Поскольку 111-й аминокислотный остаток в белке Gao *D. melanogaster* это цистеин, для введения SS-связи между аминокислотными остатками 82 и 111 достаточно сделать только одну аминокислотную замену — V82C.



6

65	DVKQYKPVVY	75	SNTIQSLPAI	85	VRAMDTLQVE
	<b>DFKQYRPVVY</b>		<b>SNTIQSLPAI</b>		<b>LRAMPTLSIQ</b>
95	YGDKERKTDS	105	KMVCVLSRM	115	EDTEFFSAEL
	<b>YSNNERESDA</b>		<b>KMVFVLSRM</b>		<b>HDTEPFSEEL</b>
125	LSAMMRLWGD	135	SGIQECFNRS	145	REYQLNDSAK
	<b>LAAMKRLWQD</b>		<b>AGVQECFSRS</b>		<b>NEYQLNDSAK</b>
155	YYLDSLDRIG	165	AGDYQPTQEQ	175	ILRTRV
	<b>YFLDLDRLG</b>		<b>AKDYQPTQEQ</b>		<b>ILRTRV</b>

Рис. 2. Пространственная структура Gao *M. musculus* (PDB: 3C7K) (а); выравнивание аминокислотных последовательностей домена II белков Gao *M. musculus* (верхняя строчка) и *D. melanogaster* (нижняя строчка) (б)

**3. Исследование стабильности белка Gao с введённой SS-связью.** В работе не ставилась задача подробно исследовать белок Gao. Мы хотели всего лишь сравнить стабильность белка Gao дикого типа и его мутантной формы с SS-связью, введённой в участок полипептидной цепи, который предсказан как нативно-развёрнутый.

На рис. 3, а показаны кривые плавления белка Gao и его мутантной формы с введённой SS-связью. На каждой из кривых плавления есть два максимума, которые, вероятнее всего, связаны с плавлением двух доменов белка Gao. На рисунке видно, что положение первого пика плавления совпадает у белка дикого типа и его мутантной формы ( $T_{m1} \approx 320$  K), а положение второго пика плавления — отличается.  $T_{m2}$  для белка Gao дикого типа — 329 K, а для мутантной формы этого белка — 333 K. Таким образом, внесённая нами SS-связь стабилизирует один из доменов белка Gao и увеличивает температуру его плавления на 4 K.

Следующий опыт позволил убедиться в том, что первый пик плавления Gao связан с разрушением домена, связывающего молекулу ГДФ (домен I, см. рис. 2). В отсутствие ГДФ у белка дикого типа (рис. 3, б) и у белка с введённой SS-связью (рис. 3, в) первый пик плавления сдвигается в область меньших температур. Параметры кривых плавления (температуры максимумов и энтальпии плавления) показаны в таблице.

**Температуры максимумов ( $T_{m1}$ ,  $T_{m2}$ ) и энтальпии плавления ( $H_1$ ,  $H_2$ ), рассчитанные для доменов I и II белков**

	$T_{m1} \pm 1$ , K	$T_{m2} \pm 1$ , K	$H \pm 5$ , кДж/моль	$H_1 \pm 5$ , кДж/моль	$H_2 \pm 5$ , кДж/моль
WT + ГДФ	321	329	295	153	143
WT – ГДФ	317	329	305	148	149
V82C + ГДФ	320	333	375	80	298
V82C – ГДФ	316	332	373	84	289

Примечание.  $H$  — общая энтальпия плавления белка, рассчитанная из экспериментальных данных.

**4. Выводы и предположения.** Анализ кривых плавления белка Gao, полученных методом микрокалориметрии, позволяет сделать следующие выводы. При плавлении белка Gao сначала происходит разрушение домена I, связывающего ГДФ, а затем домена II. При этом SS-связь, спроектированная во втором домене Gao, на участке

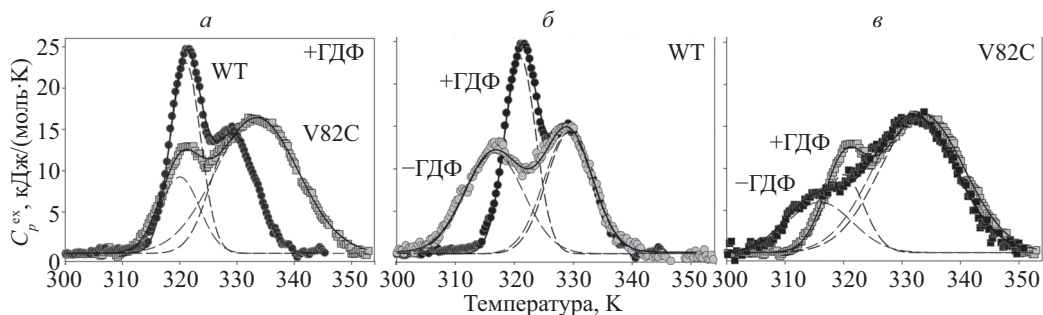


Рис. 3. Зависимость избыточной теплоёмкости белка Gao от температуры для белка Gao дикого типа (WT) и его мутантной формы с введённой SS-связью (V82C) в присутствии ГДФ (а); для Gao дикого типа в присутствии и в отсутствии ГДФ (б); для мутантной формы Gao (V82C) в присутствии и отсутствии ГДФ (в):

непрерывной линией на всех графиках показана подгонка экспериментальных данных, которая проводилась по одностадийной модели, предполагая, что домены Gao плавятся независимо; пунктирной линией показаны кривые плавления отдельных доменов, рассчитанные из подгонки общей кривой плавления

полипептидной цепи, который предсказан программами PONDR-FIT и IsUnstruct как нативно-развёрнутый, действительно стабилизирует этот домен, увеличивая температуру его плавления на 4 К.

Анализируя данные, показанные в таблице ( $H_{1,2}$  и  $T_{m1,2}$ ), можно сделать вывод, что плавление двух доменов белка Gao нельзя считать независимым, поскольку цистеиновый мостик, введённый нами в домене II, повлиял на энтальпию плавления домена I. Из таблицы видно, что значение энтальпии  $H_1$  для мутантного белка уменьшилось по сравнению со значением энтальпии  $H_1$  для белка дикого типа. При этом температура плавления первого домена ( $T_{m1}$ ) для обоих белков практически не изменилась, т. е. от одного домена белка Gao к другому могут передаваться «сигналы» в виде небольшого изменения структуры или способности взаимодействовать с лигандами. В частности, можно предположить, что SS-мостик, введённый нами в домене II Gao, мог повлиять на связывание ГДФ в домене I, что в свою очередь проявилось в изменении его энтальпии плавления. Влияние связывания лигандов на энтальпию плавления доменов белков также наблюдается у некоторых глобулярных белков [17–19].

## Литература

1. Lobanov M. Y., Sokolovskiy I. V., Galzitskaya O. V. IsUnstruct: prediction of the residue status to be ordered or disordered in the protein chain by a method based on the Ising model // J. Biomol. Struct. Dyn. 2013. N 31. P. 1034–1043.
2. Xue B., Dunbrack R. L., Williams R. W., Dunker A. K., Uversky V. N. PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids // Biochim. Biophys. Acta. 2010. N 1804. P. 996–1010.
3. Ishida T., Kinoshita K. PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence // Nucleic Acids Res. 2007. N 35. P. 460–464.
4. McGuffin L. J. Intrinsic disorder prediction from the analysis of multiple protein fold recognition models // Bioinformatics. 2008. N 24. P. 1798–1804.
5. Jones D. T., Ward J. J. Prediction of disordered regions in proteins from position specific score matrices // Proteins. 2003. N 53. (Suppl. 6). P. 573–578.
6. Linding R., Jensen L. J., Diella F., Bork P., Gibson T. J., Russell R. B. Protein disorder prediction: implications for structural proteomics // Structure. 2003. N 11. P. 1453–1459.
7. Schlessinger A., Liu J., Rost B. Natively unstructured loops differ from other loops // PLoS. Comput. Biol. 2007. N 3. P. e140.



8. Melnik B. S., Povarnitsyna T. V., Glukhov A. S., Melnik T. N., Uversky V. N., Sarma R. H. SS-Stabilizing proteins rationally: Intrinsic disorder-based design of stabilizing disulphide bridges in GFP // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2012. N 29. P. 815–824.
9. Melnik T. N., Povarnitsyna T. V., Glukhov A. S., Uversky V. N., Melnik B. S. Sequential melting of two hydrophobic clusters within the green fluorescent protein GFP-cycle3 // *Biochemistry*. 2011. N 50. P. 7735–7744.
10. Pierce K. L., Premont R. T., Lefkowitz R. J. Seven-transmembrane receptors // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. N 3. P. 639–650.
11. Tishchenko S., Gabdulkhakov A., Tin U., Kostareva O., Lin C., Katanaev V. L. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of *Drosophila melanogaster* Galphao-subunit of heterotrimeric G protein in complex with the RGS domain of CG5036 // *Acta Crystallogr. (F)*. 2013. N 69. P. 61–64.
12. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
13. Senin A. A., Potekhin S. A., Tiktopylo E. I., Filimonov V. V. Differential scanning microcalorimetry SCAL-1 // *J. Therm. Anal. Cal.* 2000. N 62. P. 153–160.
14. Privalov P. L., Potekhin S. A. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins // *Methods Enzymol.* 1986. N 131. P. 4–51.
15. Slep K. C., Kercher M. A., Wieland T., Chen C. K., Simon M. I., Sigler P. B. Molecular architecture of Galphao and the structural basis for RGS16-mediated deactivation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2008. N 105. P. 6243–6248.
16. RCSB Protein Data Bank. URL: <http://www.rcsb.org> (дата обращения: 10.05.2016).
17. Kikuchi Y., Naka Y., Osakabe H., Okamoto T., Masaike T., Ueno H., Toyabe S., Muneyuki E. Thermodynamic analyses of nucleotide binding to an isolated monomeric beta subunit and the alpha3beta3gamma subcomplex of F1-ATPase // *Biophys. J.* 2013. N 105. P. 2541–2548.
18. Takahashi K., Casey J. L., Sturtevant J. M. Thermodynamics of the binding of D-glucose to yeast hexokinase // *Biochemistry*. 1981. N 20. P. 4693–4697.
19. Tischenko V. M., Abramov V. M., Zav'yalov V. P. Investigation of the cooperative structure of Fc fragments from myeloma immunoglobulin G // *Biochemistry*. 1998. N 37. P. 5576–5581.
20. National Library of Medicine. UPL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 15.05.2016).

## References

1. Lobanov M. Y., Sokolovskiy I. V., Galzitskaya O. V. IsUnstruct: prediction of the residue status to be ordered or disordered in the protein chain by a method based on the Ising model. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2013, no 31, pp. 1034–1043.
2. Xue B., Dunbrack R. L., Williams R. W., Dunker A. K., Uversky V. N. PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, no 1804, pp. 996–1010.
3. Ishida T., Kinoshita K. PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Res.*, 2007, no 35, pp. 460–464.
4. McGuffin L. J. Intrinsic disorder prediction from the analysis of multiple protein fold recognition models. *Bioinformatics*, 2008, no 24, pp. 1798–1804.
5. Jones D. T., Ward J. J. Prediction of disordered regions in proteins from position specific score matrices. *Proteins*, 2003, no 53 (suppl. 6), pp. 573–578.
6. Linding R., Jensen L. J., Diella F., Bork P., Gibson T. J., Russell R. B. Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure*, 2003, no 11, pp. 1453–1459.
7. Schlessinger A., Liu J., Rost B. Natively unstructured loops differ from other loops. *PLoS. Comput. Biol.*, 2007, no 3, pp. e140.
8. Melnik B. S., Povarnitsyna T. V., Glukhov A. S., Melnik T. N., Uversky V. N., Sarma R. H. SS-Stabilizing proteins rationally: Intrinsic disorder-based design of stabilizing disulphide bridges in GFP. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2012, no 29, pp. 815–824.
9. Melnik T. N., Povarnitsyna T. V., Glukhov A. S., Uversky V. N., Melnik B. S. Sequential melting of two hydrophobic clusters within the green fluorescent protein GFP-cycle3. *Biochemistry*, 2011, no 50, pp. 7735–7744.
10. Pierce K. L., Premont R. T., Lefkowitz R. J. Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002, no 3, pp. 639–650.
11. Tishchenko S., Gabdulkhakov A., Tin U., Kostareva O., Lin C., Katanaev V. L. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of *Drosophila melanogaster* Galphao-subunit of heterotrimeric G protein in complex with the RGS domain of CG5036. *Acta Crystallogr. (F)*, 2013, no 69, pp. 61–64.

12. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685.
13. Senin A. A., Potekhin S. A., Tiktupulo E. I., Filimonov V. V. Differential scanning microcalorimetry SCAL-1. *J. Therm. Anal. Cal.*, 2000, no 62, pp. 153–160.
14. Privalov P. L., Potekhin S. A. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods Enzymol.*, 1986, no 131, pp. 4–51.
15. Slep K. C., Kercher M. A., Wieland T., Chen C. K., Simon M. I., Sigler P. B. Molecular architecture of Galphao and the structural basis for RGS16-mediated deactivation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2008, no 105, pp. 6243–6248.
16. *RCSB Protein Data Bank*. Available at: <http://www.rcsb.org> (accessed 10.05.2016).
17. Kikuchi Y., Naka Y., Osakabe H., Okamoto T., Masaike T., Ueno H., Toyabe S., Muneyuki E. Thermodynamic analyses of nucleotide binding to an isolated monomeric beta subunit and the alpha3beta3gamma subcomplex of F1-ATPase. *Biophys. J.*, 2013, no 105, pp. 2541–2548.
18. Takahashi K., Casey J. L., Sturtevant J. M. Thermodynamics of the binding of D-glucose to yeast hexokinase. *Biochemistry*, 1981, no 20, pp. 4693–4697.
19. Tischenko V. M., Abramov V. M., Zav'yalov V. P. Investigation of the cooperative structure of Fc fragments from myeloma immunoglobulin G. *Biochemistry*, 1998, no 37, pp. 5576–5581.
20. *National Library of Medicine*. UPL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed 15.05.2016).

Статья поступила в редакцию 30 июня 2016 г.

#### Контактная информация

Нагибина Галина Сергеевна — старший лаборант; e-mail: [ngala@phys.protres.ru](mailto:ngala@phys.protres.ru)

Джус Ульяна Феликсовна — ведущий инженер.

Глухов Анатолий Сергеевич — инженер-исследователь.

Мельник Татьяна Николаевна — кандидат физико-математических наук.

Мельник Богдан Степанович — кандидат физико-математических наук.

*Nagibina Galina Sergeevna* — Research Assistant; e-mail: [ngala@phys.protres.ru](mailto:ngala@phys.protres.ru)

*Dzhus U. F.* — Senior Engineer.

*Glukhov A. S.* — Research Engineer.

*Melnik T. N.* — PhD.

*Melnik B. S.* — PhD.